

Disk-elektrophoretische Untersuchungen zur post-
natalen Differenzierung des Enzymmusters der al-
kalischen Phosphatase und Malatdehydrogenase im
Darm der Ratte

Helmut Ga b b e r t

1974

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Pathologischen Institut der Johannes
Gutenberg-Universität Mainz
(Direktor: Professor Dr. H. Bredt)

Disk-elektrophoretische Untersuchungen zur post-
natalen Differenzierung des Enzymmusters der al-
kalischen Phosphatase und Malatdehydrogenase im
Darm der Ratte

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz,
den medizinischen Fachbereichen

vorgelegt von
Helm u t G a b b e r t
aus Kaiserslautern
Mainz 1973

Fachbereichsdekan:

Professor Dr. R. Wolf

Referent:

Professor Dr. A. Schäfer

Korreferent:

Professor Dr. H. Bredt

Tag der mündlichen Prüfung:

26. Juni 1974



Gesamtherstellung



DITTERS BÜRODIENST

6501 HEIDESHEIM/RHEIN

AM KAPELLCHEN 1 · RUF 0 61 32 / 57 11

M E I N E N E L T E R N G E W I D M E T

Inhaltsverzeichnis

	<u>Seite</u>
I. EINLEITUNG	1
II. MATERIAL UND METHODE	4
1. Tiermaterial	4
2. Elektrophoresematerial	5
3. Färbematerial	8
4. Ausführung der Elektrophorese	10
III. EIGENE ERGEBNISSE	13
1. Alkalische Phosphatase	13
2. Malatdehydrogenase	21
IV. DISKUSSION	24
V. ZUSAMMENFASSUNG	34a
VI. LITERATURVERZEICHNIS	35
VII. LEBENSLAUF	44

I. EINLEITUNG

Die alkalische Phosphatase (a.Ph.) ist aufgrund ihres reichen Vorkommens in vielen Organen, wie der Leber (MOSS, 1962), der Niere (BUTTERWORTH, 1965), dem Knochen (ROBISON, 1923), oder dem Darm (MOSS, 1965), eines der am meisten untersuchten Enzyme. Wie licht- und elektronenmikroskopische Studien zeigen, ist die alkalische Phosphatase der Säugetiere in erster Linie an absorptiven oder sekretorischen Oberflächen lokalisiert (REALE, 1962; GOLDFISCHER, 1964; MIZUTANI, 1965). Im Darm findet man sie dementsprechend vor allem in der Außenmembran der Mikrovilli als einer Komponente der epithelialen Zellen (OVERTON, 1965; HUGON, 1966). Diese Lokalisation im Bürstensaum des Darmes gibt zu vielen Mutmaßungen über mögliche Funktionen Anlaß. So spricht ihr LOJDA (1970) eine Rolle im transmembranären Stoffwechseltransport zu. Während VERZAR (1936 u. 1952) diese Rolle bei der Glukoseresorption als gegeben sieht, weist PORTMANN (1963, 1968a u. b) auch noch eine Glukoseresorption nach selektiver Hemmung der Dünndarmphosphatase nach. Wieder andere Autoren schließen auf eine Beteiligung bei der Fettresorption (KLEIN, 1967). Wenn auch die Vielfalt der postulierten Funktionen nicht als gesichert gelten kann, so führten die zahlreichen Funktionsstudien über die alkalische Phosphatase doch zu wertvollen neuen Erkenntnissen, die als Teilaspekte zu einem späteren Verständnis der Funktion aufzufassen sind. So wurden mit biochemischen, histochemischen und auch immunologischen Methoden nicht nur quantitativ,

sondern auch qualitativ variierende Enzymmuster während der Entwicklung im Darm der Maus und Ratte beobachtet (MOOG, 1961, 1962, 1966, 1968; PELICHOVA, 1966; ETZLER, 1968a u. b; HARRISON, 1971; SAINI, 1972; HÖHN u. SCHÄFER, 1972). SCHÄFER (1972) kombinierte elektronenmikroskopische und enzymhistochemische Untersuchungen und gab damit einen umfassenden Einblick in die Verknüpfung von Struktur und Enzymbesetzung des Rattendarmes zu verschiedenen Zeiten der Entwicklung. Alle diese Ergebnisse ferment-chemischer Differenzierung kann man als Teil einer Biomorphose ansehen, unter der BÜRGER (1959) die Gesamtheit der Veränderungen von Struktur und Funktion versteht.

Im Vergleich zur alkalischen Phosphatase ist die Malatdehydrogenase (MDH) Gegenstand relativ weniger Untersuchungen. Der Grund dafür dürfte einmal in einem Dominieren der Lactatdehydrogenase liegen, deren molekulare Erforschung die der MDH etwas in den Hintergrund drängte; zum anderen dürfte auch das Wissen um die Funktion der MDH dazu beigetragen haben, eine größere Zahl weiterer Untersuchungen weniger wertvoll erscheinen zu lassen.

Ihre Funktion ergibt sich, wie die der meisten Dehydrogenasen, aus ihrer Stellung im intermediären Stoffwechsel. Während CHRISTIE u. JUDAH (1954) eine mitochondriale und eine zytoplasmatische Form des Enzyms beschrieben, ebenso wie THORNE (1960), berichten andere Autoren schon vom Auftreten von mehr als 2 Formen der Malatdehydrogenasen (THORNE, 1963; CONKLIN, 1965; MANN, 1968; IKEDA, 1971). Diese und andere Ergebnisse führten zu der Frage hin, ob es bei der

Malatdehydrogenase nicht, wie dies bei der a.Ph. des Darms schon beschrieben worden war, auch zu qualitativen und quantitativen Altersveränderungen komme.

Die vorliegende Arbeit befaßt sich nun mit der postnatalen Differenzierung des Enzymmusters der a.Ph. und MDH im Darm der Ratte. Sie kann einen weiteren Beitrag zur ferment-chemischen Differenzierung des Rattendarms liefern, da die verwendete Methode der Polyacrylamid Disk Elektrophorese die Möglichkeit bietet Enzymmuster darzustellen und sie damit vor allem differenziertere qualitative Aussagen über die enzymatische Entwicklung machen kann.

Die Ausarbeitung der Polyacrylamid Disk Elektrophorese ist ein Verdienst ORNSTEINS (1964) und DAVIS (1964). Als Weiterentwicklung der gebräuchlichen Elektrophorese bietet sie den Vorteil einer Konzentrierung der Probe vor der Auftrennung in einem Sammelgel und den zusätzlichen Trenneffekt durch ein reproduzierbares Raumgitter im Trenngel, was als Molekularsiebeffekt bezeichnet wird.

II. MATERIAL UND METHODE

1. Tiermaterial

Alle Versuche wurden mit Ratten eines Wistar-Stammes, aus der Zucht des Pathologischen Institutes Mainz, durchgeführt. Um tagesrhythmisch bedingte Schwankungen der Enzymaktivität auszuschließen wurden alle Untersuchungen um 16 Uhr durchgeführt (MIKA, 1972). Das Untersuchungsgut umfaßte jeweils 3 männliche Ratten folgender 7 postnataler Altersstufen: 1. Tag, 10. Tag, 15. Tag, 20. Tag, 25. Tag, 3 Monate alte Tiere und 18 Monate alte Tiere.

Den Versuchstieren wurden folgende drei Darmabschnitte in Äthernarkose entnommen: Duodenum, 1 cm nach dem Pylorus; unteres Ileum, 1 cm vor der Ileocoecalklappe und Colon ascendens, 1 cm nach der Ileocoecalklappe. Von jedem Darmabschnitt wurden, nach Reinigung in kalter Ringerlösung, 0,1 g abgewogen und anschließend in 1,66 ml ebenfalls kalter Ringerlösung 20 Sekunden lang homogenisiert. Als Homogenisator diente das Gerät "Ultra-Turrax" (Firma Yanke und Kunkel KG, Staufen i.Br.).

Das Homogenisat wurde 10 Minuten lang bei 4000 U/Min. zentrifugiert. Zu 0,1 ml Überstand wurden 1,9 ml kalte 40 %ige Saccharose pipettiert. Von dieser Lösung wurden jeweils 0,3 ml für die diskoelektrophoretische Trennung verwandt. Um einen Aktivitätsverlust der untersuchten Enzyme weitgehend

zu vermeiden, wurden die oben beschriebenen Arbeitsgänge größtenteils im Eisbad durchgeführt.

Da im Darm neugeborener Ratten niedrigere Gewichtsverhältnisse vorliegen als bei erwachsenen Tieren, mußte das Gewicht der Darmabschnitte und in entsprechendem Verhältnis auch die zugesetzten Lösungen bei diesen Tieren reduziert werden.

2. Elektrophoresematerial

Es wurde die diskontinuierliche Polyacrylamid-Elektrophorese angewandt (ORNSTEIN, 1964; DAVIS, 1964).

a) Alkalische Phosphatase (modifiziert nach ALLEN u. HYNICK, 1963)

1. Herstellung des Sammelgels

Lösung A:	5,7 g Tris ¹	ad 100 ml H ₂ O
Lösung B:	2,5 g Bis ²	ad 100 ml H ₂ O
Lösung C:	4,0 mg Riboflavin	ad 100 ml H ₂ O

-
- 1 Tris: Trishydroxymethylaminomethan
2 Bis : N,N'-Methylenbisacrylamid

Zur Herstellung eines 3,3 %-igen Sammelgels von pH 6,9 wurden die Lösungen in folgendem Verhältnis gemischt:
1 Teil Lösung A, 2 Teile Lösung B, 1 Teil Lösung C,
4 Teile Lösung D.

2. Herstellung des Trenngels

Lösung A:	48,0 ml 1n HCL	
	36,3 g Tris	 ad 100 ml H ₂ O
	0,23 ml Temed ³	
Lösung B:	30,0 g Acrylamid	
	0,8 g Bis	 ad 100 ml H ₂ O
Lösung C:	0,14 g Per ⁴	 ad 100 ml H ₂ O

Zur Herstellung eines 7,5 %-igen Gels von pH 8,9 wurden die Lösungen in folgendem Verhältnis gemischt: 1 Teil Lösung A, 2 Teile Lösung B, 4 Teile Lösung C, 1 Teil H₂O.

Herstellung des Elektrolyt-puffers

6,0 g	Tris	ad 1000 ml H ₂ O
0,1 g	G. p. in	

Zum Gebrauch wird dieser Puffer von pH 8,3 10-fach verdünnt.

Temed: N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin

4 Per : Ammoniumperoxodisulfat

4. Herstellung der Bromphenolblaulösung

10,0 mg Bromphenolblau ad 1000 ml H₂O

b) Malatdehydrogenase (modifiziert nach DIETZ u. LUBRANO, 1967)

1. Herstellung des Trenngels

Lösung A:	48,0 ml 1n HCL	
	36,3 g Tris	 ad 100 ml H ₂ O
	0,23 ml Temed	
Lösung B:	30,0 g Acrylamid	
	0,8 g Bis	 ad 100 ml H ₂ O
Lösung C:	0,14 g Per	 ad 100 ml H ₂ O

Zur Herstellung eines 7,5 %-igen Gels von pH 8,9 wurden die Lösungen in folgendem Verhältnis gemischt: 1 Teil Lösung A, 2 Teile Lösung B, 4 Teile Lösung C, 1 Teil H₂O.

2. Herstellung des Elektrodenpuffers

6,0 g	Tris	
20,0 g	Glycin	 ad 1000 ml H ₂ O

Zum Gebrauch wird dieser Puffer von pH 8,3 10-fach verdünnt.

3. Herstellung der Bromphenolblaulösung

10,0 mg Bromphenolblau ad 1000 ml H₂O

3. Färbematerial

a) Alkalische Phosphatase (nach PEARSE, 1968)

Na-1-naphthylphosphat		1 mg/ml Puffer
Variaminblausalz B		1 mg/ml Puffer
Tris-HCL-Puffer, pH 9,5		20 ml
		20 ml pH 9,5

Inkubationszeit: 1. - 20. Tag: 25 Minuten bei 37°C
25. Tag - 18 Monate: 90 Minuten bei 37°C
Nachbehandlung: 2-minütiges Spülen unter fließendem Wasser und Lagerung der Gele in 7 %-iger Essigsäure

b) Malatdehydrogenase (nach PEARSE, 1960)

Die Inkubationslösung für die Malatdehydrogenase besteht aus einer Stammlösung und einer Substratlösung.

Stammlösung

Nitro-blau Tetrazolium	1mg/ml H ₂ O.....	5 ml
Tris Puffer	pH 7,4.....	5 ml
Na-Cyanid	0,1 m.....	2 ml
H ₂ O		6 ml
		pH 7,4 18 ml

Substratlösung

Na-Malat 0,31 g	ad 2 ml
Stammlösung	18 ml
Substratlösung	2 ml
20 ml	

Pro 10 ml Inkubationslösung werden 20 mg β -Nicotinamid-adenindinucleotid (DPN) hinzugefügt, sowie 0,25 ml Phenazin-methosulfat (1 mg/ml H₂O).

Inkubationszeit: 60 Minuten bei Zimmertemperatur

Nachbehandlung : 2-minütiges Spülen der Gele unter Wasser
und Lagerung in 7 %-iger Essigsäure.

4. Ausführung der Elektrophorese

Zur Durchführung der Diskelektrophorese wurden detaillierte Anweisungen von ORNSTEIN (1964), DAVIS (1964) sowie MAURER (1968) benutzt. Die Geräte mit Anleitung stammen von der Firma Canalco.

1. Die Gelröhrchen werden in Chromschwefelsäure gereinigt, in Aqua destillata gespült, darauf 2 Minuten in eine 1 %-ige Lösung Column Coat (der Firma Canalco) eingetaucht und in senkrechter Stellung im Trockenschrank getrocknet.

Die an beiden Enden offenen Gelröhrchen werden senkrecht in den Gelzubereitungsständer eingesetzt und dabei die untere Öffnung mit Parafilm verschlossen.

Die frisch angesetzte Trenngellösung wird, unter Vermeidung von Luftblasen, bis zu einer angebrachten 40 mm Marke in die Röhrchen eingefüllt. Man bedient sich dabei einer 10 ml Spritze mit aufgesetztem Polyäthylenschläuchelchen.

Damit bei der Gelierung an der Oberfläche der Gele kein Meniskus entsteht, werden die Gele vorsichtig mit Wasser überschichtet. Man benutzt dazu eine Tuberkulinspritze mit feiner Nadel und läßt das Wasser an der Innenwand der Röhrchen langsam herunterlaufen.

Die anschließende Polymerisation der Trenngellösung für die Malatdehydrogenase dauert 30 Minuten, die Polymerisation der Trenngellösung für die alkalische Phosphatase 60 Minuten.

6. Nach der Gelierung wird das überschichtete Wasser mit Filterpapierstreifen wieder vorsichtig abgesaugt.
7. Im Falle der alkalischen Phosphatase wird jetzt über das Trenngel noch ein 10 mm hohes Sammelgel polymerisiert. Man geht dabei wie oben beschrieben vor. Die Dauer der Gelierung beträgt 45 Minuten.
8. Jetzt werden jeweils 0,3 ml der Substanzlösung, deren Zubereitung schon beschrieben wurde, mit der Pipette über der Geloberfläche in die Röhrchen gefüllt.
9. Die Gelröhrchen werden darauf in den Elektrophoresetopf eingesetzt.
10. Der kalte Elektrodenpuffer (5°C) wird in den oberen und unteren Raum des Elektrophoresetopfes eingefüllt, und dem Puffer des oberen Raumes werden noch 2 ml Bromphenolblaulösung zugesetzt. Dieser Farbstoff wandert den aufgetrennten Enzymbanden voraus und gibt nach Durchlaufen des Gelröhrchens das Ende der Elektrophorese an. Unter einer Klemmenspannung von 300 Volt und einer Stromstärke von 2,5 mA pro Gelröhrchen beträgt die durchschnittliche Dauer der Elektrophorese bei Auftrennung der alkalischen Phosphatase 105 Minuten, bei Auftrennung der Malatdehydrogenase 90 Minuten.
11. Am Ende der Elektrophorese werden die Gelröhrchen dem Elektrophoresetopf entnommen und die Gele aus den Röhrchen entfernt. Man benutzt zu diesem Vorgang eine Spritze mit abgestumpfter Stahlnadel. Nachdem man die Nadel, unter leichtem und gleichmäßigen Einspritzen von Wasser, an der Innenwand der Röhrchen um die Gele herumgeführt hat, gleiten diese leicht und unverletzt heraus.

12. Die Gele werden sofort in die Inkubationsröhrchen eingelegt und mit 2 ml Inkubationslösung überschichtet. Die Inkubationsdauer beträgt bei der alkalischen Phosphatase bis zum 20. Lebenstag 25 Minuten, ab dieser Altersstufe 90 Minuten bei jeweils 37°C. Die Malatdehydrogenase wird 60 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert. In dieser Zeit färben sich die Enzymfraktionen als Banden an, indem sie über das in der Inkubationslösung angebotene spezifische Substrat mit dem Farbstoff reagieren.
13. Die Inkubation wird beendet durch ein zweiminütiges Spülen der Gele unter fließendem Wasser und Einlagerung der Gele in, mit 7 %-iger Essigsäure gefüllte, Reagenzgläser. Mit einem Korken verschlossen können in ihnen die Gele über Wochen, fast ohne Farbverlust, gelagert werden.
14. Da die Gele in der Essigsäure noch aufquellen, erfolgt die densitometrische Auswertung erst am nächsten Tag, zu einem festgelegten Zeitpunkt nach Einlagerung der Gele in die Essigsäure. Benutzt wurde der Densitometer Modell G, der Firma Canalco.

III. EIGENE ERGEBNISSE

Pro Altersstufe eines jeden Darmabschnittes wurden 9 elektrophoretische Trennungen durchgeführt und densitometrisch ausgewertet. Dabei ergaben sich folgende Ergebnisse.

1. Alkalische Phosphatase

Duodenum: Am ersten postnatalen Tag findet sich im Duodenum eine Enzymbande, die bis zum 20. Lebenstag nachweisbar ist. Ihre Aktivität, die sich in der Farbtintensität und der Breite der Bande äußert, fällt vom ersten bis zum 10. Lebenstag stark ab. Am 15. Tag entspricht die Aktivität etwa derjenigen vom 10. Tag, während sie am 20. Lebenstag wieder leicht ansteigt. An diesem Tag tritt zusätzlich ein Aktivitätsschleier ober- und unterhalb der Enzymbande auf (Abb. 1).

Am 25. Lebenstag finden sich 3 Enzymbanden, die sich auch bei den 18 Monate alten Tieren noch darstellen lassen. Während bei den 3 und 18 Monate alten Tieren die 3 Enzymbanden deutlich getrennt sind, liegen am 25. Lebenstag die 1. und 2. Bande noch eng zusammen. Mit dem Auftreten dieser 3 Enzymfraktionen kommt es zu einem starken Aktivitätsabfall, der eine Verlängerung der Inkubationszeit auf 90 Minuten erforderlich macht. Dies erklärt auch die verstärkte Hintergrundfärbung (Abb. 1).

Die Enzymbanden I und III zeigen bei den 18 Monate alten Tieren gegenüber den 3 Monate alten einen Aktivitätsverlust zugunsten der Enzymbande II.

Ileum: Das Ileum zeigt am 1. postnatalen Tag eine Enzymbande, am 10., 15. und 20. Lebenstag 2 Enzymfraktionen. Die schon am ersten Lebenstag vorgefundene Enzymbande nimmt in ihrer Aktivität bis zum 15. Lebenstag zu und bleibt bis zum 20. Lebenstag dann etwa gleich. Die Enzymfraktion, die am 10. Lebenstag als zweite Bande auftritt, nimmt in ihrer Stärke bis zum 15. Lebenstag zu, fällt aber bis zum 20. Lebenstag unter ihre Aktivität vom 10. Lebenstag ab.

Obwohl auch im Ileum vom 25. Lebenstag an die Inkubationszeit auf 90 Minuten verlängert wurde, lassen sich hier nur andeutungsweise 3 Aktivitätszonen erkennen, die sich densitometrisch nicht mehr auswerten lassen. Dasselbe gilt noch ausgeprägter für das 3 Monate und 18 Monate alte Tier

A. :

Colon ascendens: Am ersten Lebenstag tritt im Colon ascendens eine Enzymbande auf, die am 10. Lebenstag und an den darauffolgenden Lebenstagen nicht mehr nachweisbar ist (Abb. 3).

Zusammenfassender Vergleich der 3 Darmabschnitte

Vom ersten bis zum 20. Lebenstag ist die Enzymaktivität der alkalischen Phosphatase im Ileum bedeutend höher als

im Duodenum (Abb. 4 u. 5). Während ihre Aktivität bis zum 20. Lebenstag im Ileum zunimmt, nimmt sie im Duodenum ab. Am 25. Lebenstag hat sich das Aktivitätsgefälle zwischen Ileum und Duodenum umgekehrt: Im Duodenum findet sich die höchste Aktivität, während das Ileum nur noch angedeutete Aktivitätszonen aufweist. Diese Verhältnisse sind auch im 3. und 18. Monat noch zu verzeichnen (Abb. 6). Im Colon ascendens ist der Enzymnachweis am 10. Lebenstag negativ.

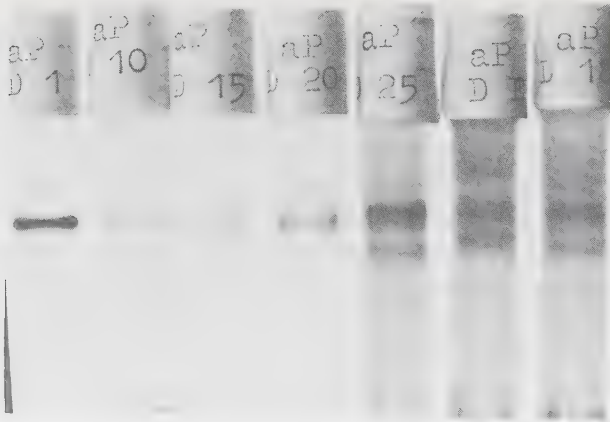


Abb. 1: Enzymmuster der alkalischen Phosphatase im Duodenum zu folgenden Altersstufen: 1., 10., 15., 20., 25. Tag, 3. und 18. Monat.

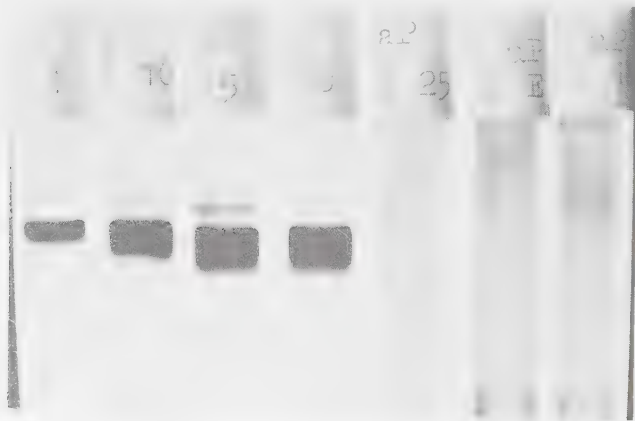


Abb. 2: Enzymmuster der alkalischen Phosphatase im Ileum zu folgenden Altersstufen: 1., 10., 15., 20., 25. Tag, 3. und 18. Monat

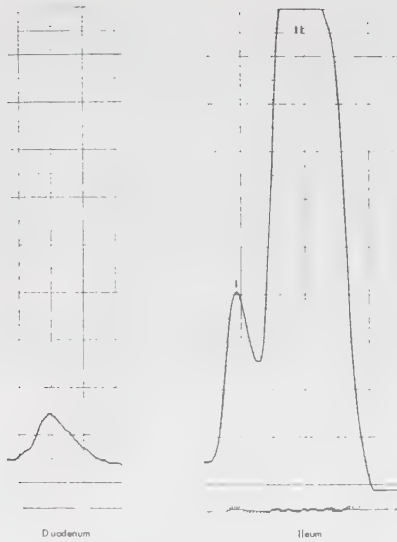


Abb. 3: Enzymmuster der alkalischen Phosphatase im Colon ascendens am 1. und 10. Lebenstag.



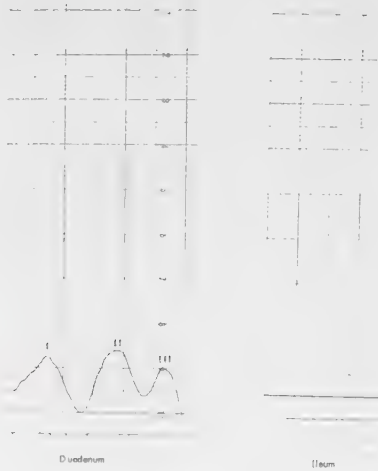
Densitometrische Auswertung der alkalischen Phosphatase 1. Lebenstag

1: Densitometrische Auswertung des Enzymmusters der alkalischen Phosphatase am 1. Lebenstag. Links: Duodenum, rechts: Ileum.



Densitometrische Auswertung der alkalischen Phosphatase : 15. Lebenstag

Abb. 5: Densitometrische Auswertung des Enzymmusters der alkalischen Phosphatase am 15. Lebenstag. Links: Duodenum, rechts: Ileum.



Densitometrische Auswertung der alkalischen Phosphatase : 3 Monate

Abb. 6: Densitometrische Auswertung des Enzymmusters der alkalischen Phosphatase einer 3 Monate alten Ratte.
Links: Duodenum, rechts: Ileum.
Beim Vergleich mit Abb. 4 u. 5 muß die von 25 auf 90 Minuten verlängerte Inkubationszeit in Betracht gezogen werden!

2. Malatdehydrogenase

Duodenum: Im Duodenum sind vom ersten Lebenstag bis zum 18 Monate alten Tier 3 Enzymbanden nachweisbar. Die Enzymfraktion II stellt sich an allen untersuchten Lebenstagen als sehr zarte Bande dar, die sehr eng der bedeutend stärkeren Enzymbande I anliegt (Abb. 7, 8 u. 9).

Ileum und Colon ascendens: In beiden Darmabschnitten lassen sich vom ersten Lebenstag bis zum 18. Monat 2 Enzymbanden darstellen.

Quantitative Aussagen sind aufgrund während der Elektrophorese aufgetretener Schwierigkeiten nicht möglich.

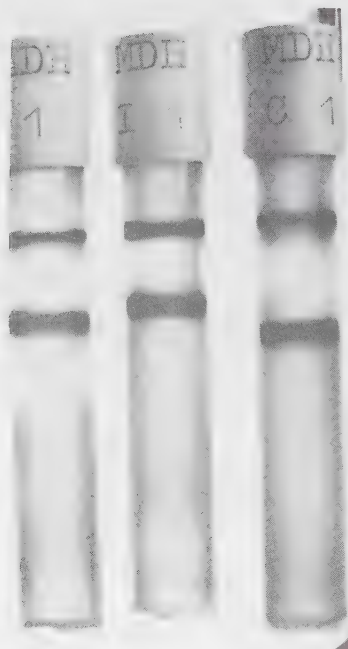


Abb. 7: Enzymmuster der Malatdehydrogenase am ersten Lebenstag im Duodenum, Ileum und Colon.

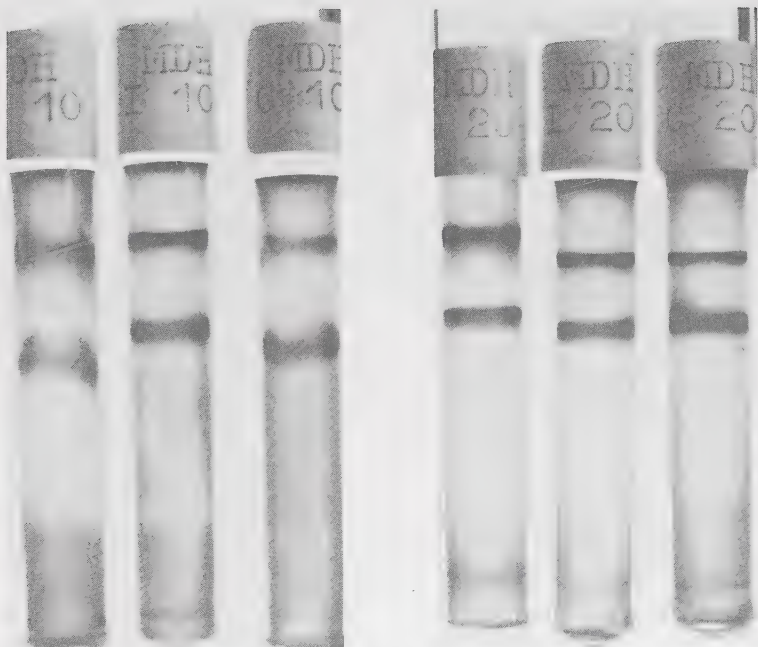


Abb. 8 u. 9: Enzymmuster der Malatdehydrogenase im Duodenum, Ileum und Colon ascendens am 10. Lebenstag (links) und am 20. Lebenstag (rechts).

IV. DISKUSSION

Während in der Histochemie die Beurteilung der Topochemie und ihrer quantitativen Änderungen im Vordergrund steht, tritt bei der elektrophoretischen Beurteilung der Chemodifferenzierung die qualitative Komponente an die Stelle der topochemischen. Gemeinsam ist beiden Methoden die Möglichkeit der quantitativen Beurteilung, wenn auch nicht in absoluten Zahlen. Deshalb erscheint es sinnvoll, die Möglichkeit des Vergleichs zu ergreifen und das Bild durch die qualitativen Aussagen der Disk-Elektrophorese und die topochemischen Aussagen der Histochemie zu vervollständigen.

Auch die elektrophoretische Differenzierung der alkalischen Phosphatase wird durch das gegensinnige Verhalten des Duodenum gegenüber dem Ileum geprägt. Während die Aktivität bei der jungen Ratte im Ileum deutlich dominiert, findet man beim erwachsenen Tier ein ausgeprägtes kranio-kaudales Aktivitätsgefälle. Entsprechende Befunde, ebenfalls an der Ratte, erhoben GOLDSTEIN u. Mitarb. (1971), HARRISON u. WEBSTER (1971), HÖHN u. SCHÄFER (1972) sowie SCHÄFER (1972). Auch an Mäusen kam MOOG (1961) zu vergleichbaren Ergebnissen.

In Anlehnung an VOLLRATH (1969) läßt sich der fermentchemische Differenzierungsprozeß nach der Geburt in 4 Abschnitte einteilen: die postnatale Phase, die Adaptationsphase, der adulte Reifezustand und das Greisenalter.

In der postnatalen Phase, vom ersten Lebenstag bis zum Ende der zweiten Woche, dominiert die alkalische Phosphatase im Ileum. Das am ersten Lebenstag noch mäßige Aktivitätsgefälle, nach proximal zum Duodenum und nach distal zum Colon ascendens, verstärkt sich bis zum 15. Lebenstag beachtlich und wird durch das Hinzutreten einer zweiten Enzymbande im Ileum, am 10. Tag, noch betont. Der Enzymnachweis im Colon ascendens ist bereits am 10. Lebenstag negativ.

Im Gegensatz zum adulten Reifezustand, mit seinem ausgeprägten kranio-kaudalen Aktivitätsgefälle, vermuten MASNEROVA u. Mitarb. (1966), WILLIAMS u. BECK (1969) sowie SCHÄFER u. HÖHN (1971) während der postnatalen Phase eine Resorption von Nahrungsbestandteilen aus der Muttermilch bis ins Colon ascendens. Bis dorthin ist auch die Muttermilch, von der sich die Tiere in dieser Phase ausschließlich ernähren, nachweisbar.

In der folgenden Adaptationsphase, vom Beginn der dritten Lebenswoche bis zur Mitte der 4. Lebenswoche, erfolgt die Angleichung des Enzymmusters der Darmschleimhaut an das erwachsener Tiere. Der leichte Aktivitätsanstieg der alkalischen Phosphatase im Duodenum, begleitet von einem neu hinzugetretenen Aktivitätsschleier ober- und unterhalb der Bande, lassen ebenso wie der starke Aktivitätsabfall der zweiten, erst am 10. Lebenstag aufgetretenen Enzymbande im Ileum die beginnende Umverteilung elektrophoretisch frühzeitig erkennen. Bis zum Ende der Adaptationsphase hat sich das kranio-kaudale Aktivitätsgefälle des adulten Reifezu-

standes ausgebildet. Während jetzt das Duodenum mit 3 Enzymbanden dominiert, läßt sich im Ileum nur noch andeungsweise Aktivität ausmachen. Neben diesen ferment-chemischen Veränderungen läßt die Adaptationsphase nicht nur eine zunehmende Umstellung der Nahrung auf Hartfutter erkennen, sondern auch strukturelle Äquivalente. So zeigte SCHÄFER (1972), daß die volle Adaptation des neonatalen Enzymverteilungsmusters an das adulter Tiere erst zu einem Zeitpunkt eintritt, zu dem licht- und elektronenmikroskopisch die charakteristische Ileumepithelzelle der Neugeborenenperiode mit ihren strukturellen Besonderheiten nicht mehr nachweisbar ist. An diese Zellform sieht er die hohe Aktivität der alkalischen Phosphatase im Ileum neugeborener Ratten gebunden. Des weiteren beschreibt OVERTON (1965) eine Verlängerung und Verdünnung der Mikrovilli während dieser Phase bei Mäusen.

Der Übergang in den adulten Reifezustand ist mit dem Ende der Adaptationsphase vollzogen und scheint genetisch fixiert zu sein (HÖHN u. SCHÄFER, 1972), da zu diesem Zeitpunkt auch die Chemodifferenzierung einer Reihe weiterer Organe der Ratte zum Abschluß kommt, unter anderem die der Leber (KOUDESTAAL u. HARDONK, 1970), des Herzens (TOTH u. SCHIEBLER, 1967) und des Kleinhirns (KUCKUK, 1967).

Auffällig ist der starke Aktivitätsverlust im Duodenum mit dem Auftreten der drei Enzymbanden am Übergang der Adaptationsphase zum adulten Reifezustand, der in Widerspruch zu Ergebnissen anderer Autoren steht, die während dieser Zeit einen Anstieg der Aktivität im Duodenum beschreiben (MOOG, 1951, 1961; GOLDSTEIN u. Mitarb., 1971; HÖHN u. SCHÄFER,

1972; SCHÄFER, 1972). Da jedoch nicht zuletzt die bisherige Übereinstimmung der elektrophoretischen Befunde mit denen der Histochemie einen methodischen Fehler ausschließt, muß nach einer anderen Erklärung gesucht werden. Es bietet sich an, diese drei Enzymbanden als "neue Formen" der alkalischen Phosphatase zu postulieren, die erst am Ende der Adaptationsphase auftreten. Deren neue Eigenschaften, wie kinetisches Verhalten, Substratbevorzugung, Empfindlichkeit gegenüber Aktivatoren oder Inhibitoren, als auch strukturelle Besonderheiten, könnten in Verbindung mit dem gleichbleibenden Nachweisverfahren zu einem scheinbaren Aktivitätsverlust führen. Eine auffallende Veränderung der Substratbevorzugung im Duodenum der Maus, kurz vor der Entwöhnung, veranlaßte auch MOOG (1961) von einem "neuen" Enzym zu sprechen, während KATO (1959) dies im Duodenum des Hühnchens, kurz vor dem Schlüpfen, beobachtete. Auch eine stärkere Bindung der "neuen Formen" der alkalischen Phosphatase an die strukturellen Bestandteile der Darmepithelzelle könnte mit zu einem scheinbaren Aktivitätsverlust beitragen, da im elektrophoretischen Zymogramm Lyoenzyme und nicht, wie in der Histochemie, Desmoenzyme zur Darstellung gelangen.

Bei der Frage nach der möglichen Herkunft des "neuen" Enzyms zeigten MOOG und GREY (1968), daß die Anwendung von Inhibitoren, sowohl der RNA- als auch der Proteinsynthese, das Auftreten des "neuen" Enzyms eher beschleunige als unterdrücke. Dies deutet daraufhin, daß es sich nicht um eine de novo Proteinsynthese handeln kann, sondern eher um die Transformation von Molekülen, die schon vorher in den

epithelialen Zellen vorhanden waren. Nach ETZLER u. MOOG (1968) kommen mehrere Umwandlungsmechanismen in Frage:

1. Eine Änderung in der Proportion der Untereinheiten, wie es während der Entwicklung der Lactatdehydrogenase beschrieben wird (MARKERT u. URSPRUNG, 1962; CAHN u. Mitarb., 1962). 2. Eine Änderung in der Struktur des Moleküls, wie es für die verschiedenen Formen der Malatdehydrogenase gefordert wird (KITTO u. Mitarb., 1966) und 3. Eine Modifikation des Moleküls durch Addition oder Abspaltung kleiner Komponenten, wie es bei der Umwandlung von Prozymogenen in aktive Moleküle vorkommt (NEURATH, 1957). Wie jedoch die letzte Sicherung dieser "neuen Enzymformen", so bedarf auch die Klärung ihres endgültigen Entstehungsmechanismus noch weiterer Untersuchungen.

Der Beginn des Greisenalters ist gegen den adulten Reifezustand nur sehr schwer abzugrenzen, dürfte jedoch bei der 18 Monate alten Ratte sicher vollzogen sein. Das Zymogramm zeigt keine allzu starken Unterschiede: Die 3 Enzymbanden im Duodenum des 3 Monate alten Tieres sind auch im Greisenalter noch vorhanden und unterscheiden sich nur durch einen sehr schwachen Aktivitätsabfall der ersten und dritten Enzymbande zugunsten der zweiten. Im Ileum stellen sich, im Gegensatz zum 3 Monate alten Tier, die angedeuteten Aktivitätszonen lediglich etwas betonter dar. Da keine experimentellen Untersuchungen über das Verhalten der alkalischen Phosphatase der Darmschleimhaut im Alter vorliegen, lassen sich nur schwer Vergleiche anstellen. Lediglich HENNING u. HEINKEL (1967) beschrieben ein Absinken der Aktivität der alkalischen Phosphatase in den Dünndarmepithe-

lien im Alter, was durch die vorliegende Untersuchung nicht bestätigt werden kann.

Am Ende des ferment-chemischen Differenzierungsprozesses stellt sich die Frage nach seinem Regulationsmechanismus. MOOG (1953 u. 1962) stellte fest, daß der Aktivitätsanstieg der alkalischen Phosphatase im Duodenum der Maus, kurz vor der Entwöhnung, unter der Kontrolle des Hypophysen-Nebennierenrinden-Systems steht. Sie konnte zeigen, daß exogen zugeführtes Cortison zu einem verfrühten Anstieg der Aktivität führt, der jedoch unabhängig von der zugeführten Menge des Hormons nur das physiologische Maximum erreicht. Dagegen verhindert eine Adrenalektomie den Aktivitätsanstieg fast völlig. Während HALLIDAY (1959) diese Wirkung des Cortison auch an der Ratte bestätigte, bekräftigte PELICHOVA (1966) den Zusammenhang zwischen Nebennierenrinde und ferment-chemischer Differenzierung der alkalischen Phosphatase noch durch die Feststellung, daß die alkalische Phosphatase durch eine Adrenalektomie in einem ungewöhnlichen Maße beeinflusst wird, im Vergleich zu anderen intestinalen Enzymen. Nach LINNEWEH (1965) kommen jedoch, außer der hormonalen Beeinflussung, noch weitere Möglichkeiten in Betracht, die enzymatischen Adaptationsvorgänge zu steuern: Eine Aktivitätssteigerung in Verbindung mit der Evolution morphologischer Strukturen (NACHMANSON u. WILSON, 1951; MOOG u. RICHARDSON, 1955; LINDBERG u. OWMAN, 1966; VOLLRATH, 1969; HUGON u. BOERGER, 1967, 1968a u. b), eine Aktivitätssteigerung durch Substratinduktion (KATO u. MOOG, 1958; KATO, 1959) und eine zentrale Steuerung der Enzymadaptation (ILYIN, 1966).

Letztlich bliebe die Frage nach der Ursache der unterschiedlichen Aktivitätsverteilung der alkalischen Phosphatase im Verlauf des Darmes zu erörtern. HARRISON u. WEBSTER (1971) sehen hierfür mehrere diskutierbare Wege. Einmal wäre es möglich, daß die Zellen der Krypten auf verschiedener Höhe des Darmes ein unterschiedliches biochemisches Potential besitzen, um ein bestimmtes Enzym hervorzubringen. Zum anderen könnte ein zunächst gleiches Potential während der folgenden Reifezeit durch luminale oder humorale Faktoren in der Produktion gewisser Enzyme beeinflußt werden. Die Möglichkeit, unterschiedliche Aktivität auf eine unterschiedliche Menge Mikrovilli enthaltender Oberfläche verschiedener Darmabschnitte zurückzuführen, schlossen MOOG (1961) und FISHER u. PARSONS (1950) durch ihre diesbezüglichen Untersuchungen an der Maus und an der Ratte aus. Zu erwähnen ist auch die Beobachtung von MOOG u. GREY (1968), daß sich die Aktivität der alkalischen Phosphatase in den epithelialen Zellen ändert, während sie aus den Krypten zu der Spitze der Zotten gleiten. Aus der engen Beziehung zwischen Aktivitätsverteilung eines Enzyms und seiner Funktion läßt sich erkennen, daß die Beantwortung der Frage nach der Ursache der unterschiedlichen Aktivitätsverteilung der alkalischen Phosphatase im Darm den bedeutensten Schritt zur Erkenntnis der Funktion darstellen wird.

Bei der elektrophoretischen Auftrennung der Malatdehydrogenase kam es, wie bei den Ergebnissen schon angedeutet, zu Schwierigkeiten, die eine klare Beurteilung der fermentchemischen Differenzierung dieses Enzyms, wie es bei der

alkalischen Phosphatase möglich war, nicht erlauben. Während es im Duodenum an allen untersuchten Tagen gelingt, die Enzymfraktion III deutlich zu trennen und darzustellen, ist dies bei den Enzymfraktionen I und II nur am 1. Lebenstag, am 20. Lebenstag, beim 18 Monate alten Tier und bedingt beim 3 Monate alten Tier möglich. An den übrigen Lebenstagen lassen sich diese Enzymbanden zwar auftrennen, sind aber zu Aktivitätsschleiern ausgezogen, die eine aussagekräftige quantitativ-densitometrische Aussage nicht zulassen.

Im Ileum und Colon ascendens, die vom ersten Lebenstag bis zum 18. Monat 2 Enzymfraktionen besitzen, liegen ähnliche Verhältnisse vor. Die Schleierbildung beschränkt sich hier jedoch an den genannten Tagen in der Hauptsache auf die Enzymbande I. Auch eine Wiederholung der gesamten Versuchsreihe führte zu keinen anderen Ergebnissen und mag so als Hinweis zu werten sein, daß es sich nicht um einen Artefakt oder methodischen Fehler handelt. So lassen sich, unter der Annahme, daß die Aktivitätsschleier irgendwelche qualitativen Veränderungen im Molekül der Malatdehydrogenase darstellen, doch auffallende Übereinstimmungen mit histochemischen Befunden erheben. Zumindest in der Aktivitätstendenz lassen sich folgende Ergebnisse bestätigen: Ein mehr oder minder ausgeprägter proximo-distaler Aktivitätsanstieg in der postnatalen Phase, in der Adaptationsphase ein Anstieg der Aktivität, besonders im Duodenum und keine einschneidenden Aktivitätsveränderungen mehr in der adulten Phase. Insgesamt läßt sich sagen, daß, im Gegensatz zur alkalischen Phosphatase, die Aktivität der Malatdehydrogenase

gleichmäßiger über die einzelnen Darmabschnitte verteilt ist und nicht so ausgeprägten Aktivitätsschwankungen während der Alterung unterliegt. Da keine andere disk-elektrophoretische Arbeit über das Verhalten der Malatdehydrogenase im Darm während der Alterung vorliegt, bietet sich ein Vergleich mit anderen Organen an. So fanden SCHMUKLER u. BARROWS (1966 u. 1967) ein recht unterschiedliches Verhalten der Malatdehydrogenase in Organen der Ratte. Während sie in der Leber und im Herz mit steigendem Alter einen signifikanten Aktivitätsanstieg verzeichneten, konnten sie in der Niere, dem Gehirn und im Skelettmuskel keine quantitativen Aktivitätsschwankungen feststellen. Ein Vergleich 12 Monate alter Ratten mit 24 Monate alten Ratten ließ dagegen bei allen untersuchten Organen keine Aktivitätsveränderungen mehr erkennen. Ohne Ergebnis hinsichtlich quantitativer Aktivitätsunterschiede blieben auch Untersuchungen am menschlichen Skelettmuskel Neugeborener gegenüber Erwachsenen. (KAR u. PEARSON, 1963). Eine Erklärung für das unterschiedliche Verhalten der Malatdehydrogenase in den verschiedenen Organen liegt nicht vor.

Während die Aktivität der alkalischen Phosphatase histochemisch nur im Bürstensaum der Darmepithelzellen nachweisbar ist und zu einer bestimmten Zeit noch in der Wand der Kapillaren, bietet die Malatdehydrogenase ab dem 5. postnatalen Tag eine zunehmend positive Reaktion nicht nur in den Darmepithelzellen, sondern auch in der glatten Muskulatur und den nervösen Plexus der Darmwand (SCHÄFER, 1972). Diese topochemischen Befunde finden ihre Berücksichtigung nicht nur in der quantitativen, sondern auch in der quali-

tativen Beurteilung der ferment-chemischen Differenzierung. So könnte der ab dem 5. Lebenstag zunehmend positiv werdende Reaktionsausfall fast aller Darmwandschichten ein strukturelles Äquivalent für die elektrophoretisch am 10. Lebenstag erstmals nachgewiesene Schleierbildung sein und damit Ausdruck gewisser qualitativer Veränderungen. Zu diesen topochemischen Veränderungen, die die gesamte Darmwand betreffen, treten noch solche der intrazellulären Topik. Diese intrazellulären Prozesse fallen in die Adaptationsphase und sind mit dem Erreichen des adulten Reifezustandes beendet.

Ein weites Feld von Untersuchungsergebnissen bietet ein Vergleich mit anderen Organen. Hier reichen die Befunde von 2 bis 9 Enzymfraktionen der Malatdehydrogenase in denselben Organen der Ratte (TSAO, 1960; SCHMUKLER u. BARROWS, 1967; EMANUELLI u. Mitarb., 1970; IKEDA u. Mitarb., 1971). Nachdem anfangs lediglich von 2 Enzymfraktionen berichtet wurde, konnten SCHMUKLER u. BARROWS (1967) zeigen, daß diese beiden Fraktionen - als mitochondriale und zytoplasmatische Form bezeichnet - aus mehreren eng beisammen liegenden Banden bestehen. Hier muß die Frage offen gelassen werden, ob es sich bei den neu nachgewiesenen Enzymfraktionen um Unterfraktionen der mitochondrialen oder zytoplasmatischen Form handelt oder um spezifische Fraktionen anderer Zellstrukturen, die nur aufgrund einer elektrophoretischen Verwandtschaft neben der mitochondrialen und zytoplasmatischen Form liegen. Für die letztere Möglichkeit spricht, daß mit zunehmender Zahl nachgewiesener Enzymfraktionen die ursprünglich betonte Zweigipfligkeit des Zymogramms abnimmt.

Als Erklärung für die unterschiedlichen qualitativen Befunde stehen mehrere Möglichkeiten zur Diskussion. Eine einfache Erklärung dürfte in der Art der angewandten Elektrophorese und ihrer speziellen Modifikationen zu suchen sein. In engem Zusammenhang hiermit wäre es demnach auch möglich, daß gewisse Enzymfraktionen in ihrem Aktivitätsgehalt unter dem Niveau liegen, das unter den gegebenen Bedingungen nachgewiesen wird. Auch die Lösung der Malatdehydrogenase aus der Zelle kann eine Rolle spielen. So konnten SCHMIDT u. Mitarb. (1966) nachweisen, daß sich die mitochondriale Form weniger leicht aus der Zelle löst, als die zytoplasmatische Form.

Weitere Untersuchungen zur endgültigen Beantwortung dieser wie auch noch anderer offen gebliebener Fragen dürfte gerade durch die zentrale Stellung der Malatdehydrogenase im intermediären Stoffwechsel aller Säugetierzellen vollends gerechtfertigt sein.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Mit Hilfe der Disk-Elektrophorese, die es ermöglicht, Enzyme in Fraktionen aufzutrennen, wurde die postnatale Differenzierung des Enzymmusters der alkalischen Phosphatase und der Malatdehydrogenase im Darm männlicher Ratten untersucht. Bearbeitet wurden Duodenum, unteres Ileum und Colon ascendens von einem Tag bis 18 Monate alten Tieren.

Im Duodenum stellte sich vom 1. bis zum 20. Tag die alkalische Phosphatase in Form einer Enzymbande dar, vom 25. Tag an in Form von drei Enzymbanden. Im Ileum wechselte das Enzymmuster von einer Enzymbande am 1. Tag, zu zwei Enzymbanden am 10. und 15. Tag und wieder einer Enzymbande am 20. Tag. Vom 25. Tag an waren nur noch schwache Aktivitätsschleier zu erkennen. Im Colon stellte sich lediglich am 1. Tag eine Enzymbande dar. Nach dem 25. Tag kehrt sich im Verlauf des Darmes das Aktivitätsgefälle um: Im Duodenum findet sich jetzt die höchste Aktivität, während das Ileum nur noch angedeutete Aktivitätszonen aufweist.

Das Enzymmuster der Malatdehydrogenase zeigt an allen untersuchten Lebenstagen im Duodenum drei Enzymfraktionen, im Ileum und Colon zwei Enzymfraktionen.

Die Ergebnisse wurden anhand elektrophoretischer sowie vergleichend histochemischer Arbeiten diskutiert.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

1. ALLEN, J.M. and G. HYNICK: Localisation of alkaline phosphatases in gel matrices following electrophoresis.
J.Histochem.Cytochem. 11, 169-175 (1963)
2. BUTTERWORTH, P.J., D.W. MOSS and E. PITKANEN: Patterns of urinary excretion of alkaline phosphatase in acute renal failure.
Clin.Chim.Acta 11, 220-226 (1965)
3. BÜRGER, M.: Altern und Krankheit.
Leipzig 1959
4. CAHN, R. et al.: Nature and development of lactic dehydrogenases.
Science 136, 962-969 (1962)
5. CHRISTIE, G.S. and J.D. JUDAH: Intracellular distribution of enzymes.
Proc.Roy.Sci. (London) 141, 420-433 (1954)
6. CONCLIN, J.L. and E.J. NEBEL: Malate dehydrogenase isozymes of the chick embryo.
J.Histochem.Cytochem. 13, 510-514 (1965)
7. DAVIS, B.J.: Disc electrophoresis: II Method and application to human serum proteins.
Ann.N.Y.Acad.Sci. 121, 404-427 (1964/65)
8. LIEBOWITZ, A.A. and F. LUBRANO: Separation and quantitation of lactic dehydrogenase isoenzymes by disc electrophoresis.
Anal.Biochem. 20, 246-257 (1967)
9. EMANUELLI, G. et al.: Emploi de la disc-électrophorèse pour la détermination des isoenzymes de la lactico-déshydrogénase et de la malico-déshydrogénase.
Schweiz.med.Wschr. 100, 1026-1028 (1970)

10. ETZLER, M.E. and F. MOOG: Immunochemical characterization of alkaline phosphatase isozymes of the young mouse duodenum.
Biochim.Biophys.Acta 154, 151-161 (1968a)
11. ETZLER, M.E. and F. MOOG: Biochemical identification and characterization of the multiple forms of alkaline phosphatase in the developing duodenum of the mouse.
Develop.Biol. 18, 515-535 (1968b)
12. FISHER, R.B. and D.S. PARSONS: The gradient of mucosal surface area in the small intestine of the rat.
J.Anat. 84, 272-282 (1950)
13. GOLDFISCHER, S., E. ESSNER and A.L. NOVIKOFF: The localization of phosphatase activities at the level of ultrastructure.
J.Histochem.Cytochem. 12, 72-95 (1964)
14. GOLDSTEIN, R. et al.: Alkaline phosphatase and disaccharidase activities in the rat intestine from birth to weaning. I Effect of diet on enzyme development.
Amer.J.Clin.Nutr. 24, 1224-1231 (1971)
15. HALLIDAY, R.: The effect of steroid hormones on the absorption of antibody by the young rat.
J.Endocrinol. 18, 56-66 (1959)
- HARRISON, D.D. and H.L. WEBSTER: Proximal to distal variations in enzymes of the rat intestine.
Biochim.Biophys.Acta 224, 432-436 (1971)
- HENNING, N. und K. HEINKEL: Der Magen-Darm-Trakt.
In: Handbuch der praktischen Geriatrie
- HÖHN, P. und A. SCHÄFER: Verteilungsmuster von Enzymaktivitäten im Darm der Ratte in verschiedenen Lebensabschnitten.
Act.geron. 2, 331-343 (1972)

19. HUGON, J. and M. BORGERS: A direct lead method for the electron microscopic visualization of alkaline phosphatase activity.
J.Histochem.Cytochem. 14, 429-432 (1966)
20. HUGON, J. and M. BORGERS: Fine structural localization of lysosomal enzymes in the absorbing cells of the duodenal mucosa of the mouse.
J.Cell.Biol. 33, 212-218 (1967)
21. HUGON, J. and M. BORGERS: Fine structural localization of acid and alkaline phosphatase activities in the absorbing cells of the duodenum of rodents.
Histochemie 12, 42-66 (1968a)
22. HUGON, J. and M. BORGERS: Fine structural localisatzion of three lysosomal enzymes and nonspecific alkaline phosphatase in the villus of the human duodenum.
Gastroenterology 55, 608-618 (1968b)
23. IKEDA, T., E. KAKU and N. OKAMOTO: MDH isoenzymes in the embryonic, fetal and neonatal rat.
Hiroshima J.M.Sci. 20, 237-243 (1971)
24. ILYIN, V.S.: Central regulation of enzyme activity and synthesis in embryonal and adult mammalian tissues. Development of metabolism as related to nutrition.
Symp. Prague 1966
Biol.Neonat 9, 215-223 (1965/66)
25. KAR, N.C. and C.M. PEARSON: Developmental changes and heterogeneity of lactic and malic dehydrogenases of human skeletal muscles and other organs.
Proc.N.A.S. 53, 100-111 (1967)
26. KATO, Y. and F. MOOG: Differences in response of phosphatase in chick embryo to injection of substrate.
Science 127, 812-813 (1958)

27. KATO, Y.: The induction of phosphatase in various organs of the chick embryo. *Develop.Biol.* 1, 477-510 (1959)
28. KITTO, G.B., P.M. WASSARMAN and N.O. KAPLAN: Enzymatically active conformers of mitochondrial malate dehydrogenase. *Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.* 56, 578-585 (1966)
29. KLEIN, U.E., H.C. DRUBE and H.T. HAUSEN: Untersuchungen über Muster und Verteilung von Enzymen in der Schleimhaut des menschlichen Gastrointestinaltraktes. II. Histochemische und ergänzende Isoenzymuntersuchungen. *Klin.Wschr.* 45, 95-101 (1967)
30. KOUDSTAAL, J. and M.J. HARDONK: Histochemical demonstration of enzymes in rat liver during postnatal development. Enzymes related to NADPH-dependent hydroxylating systems and to sexdifference. *Histochemie* 23, 71-81 (1970)
31. KUCKUK, B.: Über die Entwicklung und Chemodifferenzierung des Kleinhirns der Ratte. *Histochemie* 9, 217-155 (1967)
- LINNEWEH, F.: Postnatale Adaptation. In: *Fortschritte der Pädologie*. Hrsg. v. F. Linneweh.
- LINDBERG, T. and C. OWMAN: Intestinal dipeptidases. Development of dipeptidase activity in the small intestine of the rat as related to the development of the intestinal mucosa. *Acta Physiol.Scand.* 68, 141-151 (1966)
- LOJDA, Z. et al.: Cytochemistry of the human jejunal mucosa in the norm and malabsorption syndrome. *Current topics in Pathology* 52, 1-63 (1970)

43. MOOG, F. and D. RICHARDSON: The functional differentiation of the small intestine.
IV The influence of adrenocortical hormones on differentiation and phosphatase synthesis in the duodenum of the chick embryo.
J.Exptl.Zool. 130, 29-55 (1955)
44. MOOG, F.: The functional differentiation of the small intestine. VII Regional differences in the alkaline phosphatases of the small intestine of the mouse from birth to one year.
Develop.Biol. 3, 153-174 (1961)
45. MOOG, F.: Developmental adaptations of alkaline phosphatases in the small intestine.
Fed.Proc. 21, 51-54 (1962)
46. MOOG, F., H.F. VIRE and R.D. GREY: The multiple forms of alkaline phosphatase in the small intestine of the young mouse.
Biochim.Biophys.Acta 113, 336-349 (1966)
- MOOG, F. and R.D. GREY: Alkaline phosphatase Isozymes in the duodenum of the mouse: Attainment of pattern of spatial distribution in normal development and under influence of cortison or actinomycin.
Develop.Biol. 18, 481-500 (1968)
- MOSS, D.W.: Iso-enzymes of alkaline phosphatase in autolysed and butanol-extracted liver preparations.
Nature 191, 941-942 (1962)
- MOSS, D.W.: Properties of alkaline phosphatase fractions in extracts of human small intestine.
Biochem.J. 94, 458-462 (1965)
50. NACHMANSOHN, D. and I.B. WILSON: The enzymic hydrolysis and synthesis of acetylcholine.
Advanc.Enzym. 12, 259-262 (1951)

51. NEURATH, H.: The activation of zymogens.
Advan. Protein Chem. 12, 319-386 (1957)
52. ORNSTEIN, L.: Disc-electrophoresis I Background and theory.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 121, 321-349 (1964)
53. OVERTON, J.: Fine structure of the free surface in developing mouse intestinal mucosa.
J. Exptl. Zool. 159, 195-201 (1965)
54. PEARSE, A.G.E.: Histochemistry.
2. Aufl., Boston 1960
55. PEARSE, A.G.E.: Histochemistry.
1. Bd., 3. Aufl., London 1968
56. PELICHOVA, H. et al.: Postnatal changes of activity and electrophoretic pattern of jejunal and ileal nonspecific esterase and alkaline phosphatase of the rat. Effect of adrenalectomie.
Canadian. J. Biochem. 45, 1375-1384 (1966)
57. PORTMANN, P. and H. ROGGO: Zur Kenntnis der alkalischen Phosphatase. III Beziehung der alkalischen Phosphomonoesterase zur Glukose-resorption im Dünndarm.
Helv. Physiolog. Acta 21, 154-164 (1963)
58. PORTMANN, P. and F.I. LI-CHEN: Zur Kenntnis der alkalischen und sauren Phosphomonoesterasen und der Hexokinase des Rattendünndarms. IV Der Einfluß von Hemmstoffen auf die Aktivitäts-pH-Kurven.
Helv. Physiolog. Acta 26, 388-399 (1968a)
59. PORTMANN, P. and F.I. LI-CHEN: Zur Kenntnis der alkalischen und sauren Phosphatase des Dünndarms. V Die Beziehung zwischen der Glukoseresorption und der Aktivität der alkalischen und sauren Phosphatase und der Hexokinase im Rattendünndarm.
Helv. Physiolog. Acta 26, 400-421 (1968b)

60. REALE, E.: Electron microscopic localization of alkaline phosphatase from material prepared with the cryostat-microtome. Exp.Cell Res. 26, 210-211 (1962)
61. ROBISON, R.: The possible significance of hexose phosphoric acids in ossification. Biochem.J. 17, 286-293 (1923)
62. SAINI, P.K. and J. DONE: The diversity of alkaline phosphatase from rat intestine. Isolation and purification of the enzyme(s). Biochim.Biophys.Acta 258, 147-153 (1972)
63. SCHÄFER, A. und P. HÖHN: Vergleichende histochemische Untersuchungen über das Verteilungsmuster von oxydativen und hydrolytischen Enzymen in der Darmschleimhaut neugeborener und adulter Ratten. Verh.Dtsch.Ges.Path. 55, 438-444 (1971)
64. SCHÄFER, A.: Elektronenmikroskopische und enzymhistochemische Untersuchungen zur Struktur und Funktion der Darmschleimhaut der Ratte unter orthologischen und experimentell-pathologischen Bedingungen. Med.Habil.Schr., Mainz 1971
- SCHMIDT, E. et al.: Studien zum Austritt von Zellenzymen am Modell der isolierten, perfundierten Rattenleber. Enzym.Biol.Clin. 7, 185-202 (1966)
66. SCHMUKLER, M. and C.H. BARROWS: Age differences in lactic and malic dehydrogenases in the rat. J.Geront. 21, 109-111 (1966)
- SCHMUKLER, M. and C.H. BARROWS: Effect of age on dehydrogenase heterogeneity in the rat. J.Geront. 22, 8-13 (1967)
- THORNE, C.J.R.: Characterization of two malic dehydrogenases from rat liver. Biochim.Biophys.Acta 42, 175-176 (1960)

69. THORNE, C.J.R., R. GROSSMAN and N.O. KAPLAN: Starch-gel electrophoresis of malate dehydrogenase.
Biochem.Biophys.Acta 73, 193-203 (1963)
70. TOTH, A. und T.H. SCHIEBLER: Über die Entwicklung der Arbeits- und Erregungsleitungsmuskulatur des Herzens von Ratte und Meer-schweinchen. Histologische, histochemische und elektrophysiologische Untersuchungen.
Z.Zellforsch. 76, 543-567 (1967)
71. TSAO, M.U.: Heterogeneity of tissue dehydrogenases.
Arch.Biochem.Biophys. 90, 234-238 (1960)
72. VERZÁR, F. and E.J. Mc DOUGALL: The role of phosphatases during absorption.
In: Absorption from the intestine.
London 1936, 113-149
73. VERZÁR, F. and E. SAILER: Glucose Resorption und alkalische Phosphatase des Dünndarms nach Adrenalektomie bei mit NaCl behandelten Tieren.
Helv.Physiolog.Acta 10, 247-258 (1952)
74. VOLLRATH, L.: Über die Entwicklung des Dünndarms der Ratte. Morphologische, histochemische und experimentelle Untersuchungen.
Ergeb.Anat.Entwickl.-Gesch. 41, 7-70 (1969)
75. WILLIAMS, R.M. and F. BECK: Demonstration of alkaline phosphatase in the lysosomes of neonate rat ileum.
Histochem.J. 1, 531-538 (1969)

Herrn Prof. Dr. med. A. Schäfer danke ich herzlich für die Überlassung des Themas und für die freundliche Unterstützung.

Besonders danke ich Herrn Dr. med. P. Höhn für die Einführung in die Methoden der Disk-Elektrophorese.

VII. LEBENSLAUF

Am 18.2.1950 wurde ich, Helmut Erich Gabbert, als 1. Kind des praktischen Arztes Dr. med. Herbert Gabbert und der Ehefrau Elisabeth, geborene Mannel, in Kaiserslautern geboren.

Im Anschluß an eine vierjährige Volksschulzeit besuchte ich von 1960 bis 1968 das Staatliche Alt-sprachliche Gymnasium in Kaiserslautern, wo ich auch die Reifeprüfung ablegte.

Seit dem Wintersemester 1968/69 studiere ich an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz Medizin.

Ende des Sommersemesters 1969 absolvierte ich die Naturwissenschaftliche Vorprüfung und Ende des Wintersemesters 1970/71 die Ärztliche Vorprüfung. Nach dem Wintersemester 1973/74 beabsichtige ich das Medizinische Staatsexamen abzulegen.

